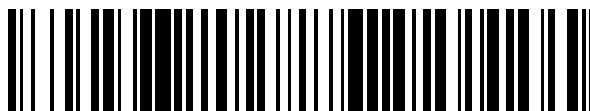


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 105**

51 Int. Cl.:

C08L 5/04 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2009 PCT/EP2009/059432**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2010 WO10010123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2009 E 09800060 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2310448**

54 Título: **Materiales nanocompuestos tridimensionales que consisten en una matriz polisacárida y nanopartículas metálicas, preparación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

23.07.2008 IT PD20080220

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.05.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITA DEGLI STUDI DI TRIESTE (100.0%)
Piazzale Europa, 1
34127 Trieste, IT**

72 Inventor/es:

**DONATI, IVAN;
MARSICH, ELEONORA;
TRAVAN, ANDREA y
PAOLETTI, SERGIO**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 611 105 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Materiales nanocompuestos tridimensionales que consisten en una matriz polisacárida y nanopartículas metálicas, preparación y uso de los mismos.

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a materiales nanocompuestos tridimensionales que comprenden una matriz polimérica compleja que consiste en una composición polisacárida de polisacáridos neutros o aniónicos y de polisacáridos catiónicos ramificados, en la que las nanopartículas metálicas se dispersan uniformemente y se estabilizan, formando así dichos polisacáridos catiónicos ramificados un nanocompuesto a base de metal. La invención se refiere adicionalmente a la preparación y uso de dichos materiales nanocompuestos tridimensionales en los campos biomédico, farmacéutico y alimentario.

15 **Estado de la técnica**

[0002] Los polisacáridos naturales se han reconocido generalmente como polímeros biocompatibles; como tales, son materiales ya estudiados empleados desde hace mucho tiempo para aplicaciones en el campo biomédico, por ejemplo como portadores de compuestos biológicamente activos o células para la ingeniería tisular. Entre los más utilizados en la industria farmacéutica y alimentaria, pueden mencionarse alginatos y quitosano por su abundancia, coste relativamente bajo, alta biocompatibilidad y capacidad para producir, en condiciones apropiadas, matrices tridimensionales en forma de hidrogeles con alto contenido de agua. Sin embargo, el quitosano presenta algunos límites de aplicación ligados a su marcada dependencia de su solubilidad en agua frente al pH, su no miscibilidad en soluciones acuosas con polisacáridos aniónicos tales como alginato, con los que produce coacervados no utilizables con fines de aplicación, tal como, por ejemplo, en ingeniería tisular. El quitosano comparte con los alginatos un límite adicional en la medida en que no lleva ninguna señal específica de célula que carezca de bioactividad. Por estas razones, los derivados de quitosano, que pueden superar los límites que se han mencionado anteriormente, se estudian y desarrollan actualmente.

[0003] En los últimos años, se han obtenido diferentes derivados de quitosano mediante modificación química de la cadena polimérica. Para estas modificaciones, se utilizan ampliamente reacciones que implican el residuo amino de las unidades de D-glucosamina, que forman la cadena lineal de quitosano. En particular, la introducción de unidades sacáridas (mono y oligosacáridos) como cadena lateral unida a N, permitió obtener derivados de quitosano solubles en agua sin necesidad de reducir el pH hasta valores ácidos, evitando de esta manera también los posibles problemas resultantes de la degradación del polímero debido a la acidez de las soluciones acuosas.

[0004] En el documento US 4.424.346 (Hall, L.D. y Yalpani, M.), se describió por primera vez la síntesis de estos derivados, así como la solubilidad acuosa de los mismos en un medio acuoso no ácido. En particular, el documento US 4.424.346 desveló que el derivado de quitosano con lactosa produce geles rígidos en soluciones acuosas a concentraciones superiores al 3-5 %, mientras que no gelifica ni precipita en sales o mezclas de ácidos (en particular, con cloruros de Ca, Cr, Zn, cromato de K, ácido bórico), y combinaciones de los mismos. Además, la patente que se ha mencionado anteriormente menciona el hecho de que el quitosano derivatizado con otro oligosacárido, es decir, celobiosa, no forma geles en soluciones acuosas *per se*, mientras que forma geles rígidos cuando se mezcla con alginato. Esta formación de gel se debe a la fuerte interacción entre las cargas policatiónicas positivas y las cargas polianiónicas negativas, lo que conduce a una coacervación del sistema, proceso que de otro modo tiene un uso limitado, por ejemplo, para la microencapsulación de material biológico, tal como células.

[0005] La Solicitud de Patente WO2007/135116 (Paoletti S. y col.) describe métodos para preparar soluciones poliméricas que contienen mezclas de polisacáridos aniónicos y catiónicos para superar el problema de la coacervación y el uso de los mismos en el campo biomédico.

[0006] Además, la Solicitud de Patente WO2007/135114 (Paoletti S. y col.) describe estructuras tridimensionales, tanto hidratadas como no hidratadas, y métodos para prepararlas a partir de las mezclas poliméricas que se han mencionado anteriormente de polisacáridos aniónicos y catiónicos gelificados con agentes gelificantes apropiados, útiles para el fin de encapsular moléculas y células farmacológicamente activas.

[0007] Otra área de investigación notablemente interesante relacionada con las nanotecnologías y con un gran interés tópico por los polisacáridos es su posible uso para preparar materiales nanocompuestos, comprendiendo, en particular, nanopartículas metálicas. De hecho, con el fin de estabilizar las nanopartículas, las soluciones

polisacáridas, que permiten obtener sistemas nanocompuestos en los que las partículas metálicas están dispersadas homogéneamente debido a las interacciones con las cadenas poliméricas, podrían utilizarse ventajosamente. Por lo tanto, el papel de los polisacáridos está relacionado con la formación y la estabilización de las nanopartículas metálicas esperando la posibilidad de aprovechar sus propiedades particulares; de hecho, se sabe que las nanopartículas metálicas están dotadas de propiedades ópticas, catalíticas y antimicrobianas particulares. De hecho, el uso de metales, tales como la plata, el oro, el cobre, el zinc y el níquel, en el campo de los materiales antimicrobianos, tiene un gran impacto en el mercado, especialmente para el tratamiento de heridas de la piel. Compañías tales como Johnson&Johnson® y Convatec® han comercializado recientemente medicamentos basados en las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de plata. Pueden encontrarse aplicaciones similares mediante los materiales nanocompuestos apropiados a base de polisacáridos para explotar la actividad antimicrobiana ya conocida de estos metales, por ejemplo, para el desarrollo de gasas, vendajes, parches. Estos últimos productos podrían estar dotados de una actividad antimicrobiana de amplio espectro o geles de alto contenido en agua con actividad bactericida. De hecho, sigue existiendo la necesidad de auxiliares terapéuticos novedosos para el tratamiento de lesiones cutáneas o de las mucosas, tales como quemaduras y ulceraciones. Estas lesiones son a menudo muy resistentes a las terapias antibióticas actualmente adoptadas; además, también necesitan efectos biológicos adicionales para la reparación tisular, por ejemplo, potenciar la proliferación celular y/o la hidratación tisular apropiada. La estructura de hidrogel tridimensional puede ser particularmente ventajosa especialmente para este último aspecto, pudiendo asegurar un entorno apropiado para la replicación celular sin interferir con el fenotipo celular.

[0008] Además, la posibilidad de obtener estructuras hidratadas tridimensionales es también particularmente interesante para aplicaciones de ingeniería de tejidos, donde es deseable combinar propiedades bioactivas típicas de polisacáridos con actividad antimicrobiana.

[0009] En el campo de la ingeniería tisular, se está realizando un gran esfuerzo para producir revestimientos antimicrobianos sobre biomateriales a implantar en el cuerpo humano; en este caso, el principal factor de riesgo está relacionado con la posible citotoxicidad de los propios agentes antimicrobianos. Por ejemplo, en el campo de la cirugía ortopédica, las operaciones de reemplazo protésico de las articulaciones y la osteosíntesis de las fracturas no expuestas representan un tipo de cirugía limpia con respecto a las infecciones quirúrgicas (Tucci G. y col., Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia, 2005; 31: 121-129). Sin embargo, la implantación de biomateriales dentro de los tejidos del huésped puede promover la aparición y subsistencia de infecciones incluso con cargas bacterianas algo bajas. A pesar del progreso en la profilaxis perioperatoria, las infecciones bacterianas y fúngicas siguen siendo muy comunes; esto se debe a un riesgo prolongado de adhesión de estos microorganismos al dispositivo ortopédico (Zimmerli W. y col., New England J. Med., 2004; 351(16): 1645-54). Estos datos apoyan la importancia de desarrollar agentes antimicrobianos alternativos para asociarse con biomateriales de nueva generación.

[0010] El documento US 7255881 (Gillis y col.) proporciona una posible solución a los problemas que se han mencionado anteriormente. De hecho, la patente desvela revestimientos a base de plata formados sobre diversos tipos de sustrato a través de técnicas tales como deposiciones químicas y físicas de una fase de vapor ("deposición química en fase vapor" CVD, "deposición física en fase vapor" PVD) y en una fase líquida para aplicaciones antimicrobianas. Respecto a los sustratos polisacáridos, en los que se deposita plata, se mencionan quitosano, alginato y ácido hialurónico. Se observa que estas técnicas no están dirigidas a la formación de nanopartículas metálicas homogéneamente dispersas dentro de matrices apropiadas, sino que abordan la formación de capas continuas de plata de superficie (nanocristalinas, policristalinas o amorfas). Además, las condiciones de temperatura y presión requeridas para estas técnicas de deposición no son compatibles con la estabilidad del polisacárido ni de las biomoléculas bioactivas (como péptidos o proteínas) que pudieran ser deseables para formar parte del soporte, ni siquiera con aplicaciones de ingeniería de tejidos que implican células vivas.

50 Resumen

[0011] Es un primer objeto de la presente invención proporcionar sistemas nanocompuestos tridimensionales, en los que las nanopartículas metálicas controladas por tamaño se dispersan homogéneamente en matrices polisacáridas, estando dichas matrices en forma de gel o en forma sólida, y cuyas propiedades son particularmente adecuadas para aplicaciones biológicas en el campo biomédico.

[0012] Es un objeto adicional que tal nanocompuesto tridimensional pueda obtenerse mediante un enfoque químico simple y económicamente conveniente, y en particular, pero no exclusivamente, produciendo hidrogeles biocompatibles y bioactivos y hidrogeles deshidratados.

[0013] Es un objeto adicional mejorar estos sistemas empleando polisacáridos fácilmente disponibles en el mercado y sin que estos polisacáridos sean sometidos a manipulaciones químicas, así como sin la necesidad de manipulaciones preparativas complejas de estos sistemas.

5

[0014] Con el fin de cumplir los objetivos que se han mencionado anteriormente, los inventores desarrollaron sistemas polisacáridos adecuados basados en composiciones al menos binarias que comprenden polisacáridos neutros o aniónicos, preferiblemente derivados de fuentes vegetales o bacterianas, y polisacáridos catiónicos ramificados, permitiendo que los últimos polisacáridos atrapen nanopartículas metálicas, y siendo los polisacáridos neutros o aniónicos capaces de formar matrices sólidas tridimensionales hidratadas o no hidratadas (por ejemplo, hidrogeles con diversas formas, microesferas, soportes, matrices fibrosas) y/o matrices de alta relación superficie/volumen (membranas húmedas o deshidratadas y películas). De esta manera, el sistema formado por polisacáridos catiónicos ramificados, que atrapan uniformemente nanopartículas metálicas, es en sí mismo un nanocompuesto.

15

[0015] Por lo tanto, en un primer aspecto, el objeto de la invención consiste en materiales nanocompuestos tridimensionales que comprenden una matriz polimérica que consiste en al menos un polisacárido neutro o aniónico (liótrofo, termótrofo o termo-liótrofo), y un nanocompuesto a base de metal que consiste en al menos un polisacárido catiónico ramificado en el que las nanopartículas metálicas están uniformemente dispersadas y estabilizadas, donde el polisacárido neutro o aniónico se gelifica por medio de gelificantes físicos o químicos adecuados, dependiendo del tipo del propio polisacárido neutro o aniónico.

20

[0016] Se pudo mezclar soluciones de polisacáridos ramificados catiónicos que contenían nanopartículas metálicas con soluciones de polisacáridos neutros o aniónicos y trabajar con un valor de pH y una fuerza iónica adecuados, para no causar formación de coacervados. Aprovechando la capacidad del polisacárido neutro o ácido para formar geles ionotrópicos o termótrofos, por medio de agentes gelificantes adecuados, fue posible obtener entonces matrices tridimensionales, hidratadas o no hidratadas, que consistían en mezclas de estos polisacáridos neutros o aniónicos y polisacáridos básicos ramificados, atrapando estas últimas nanopartículas metálicas uniformemente dispersas y estabilizadas a través del propio polisacárido básico ramificado. Por lo tanto, en un segundo aspecto, es un objeto de la invención un método de preparación de materiales nanocompuestos tridimensionales que comprende una matriz polimérica que comprende una matriz polimérica que consiste en al menos un polisacárido liótrofo, termótrofo o termo-liótrofo, neutro o aniónico, y un nanocompuesto a base de metal que consiste en al menos un polisacárido catiónico ramificado en el que las nanopartículas metálicas se dispersan uniformemente y se estabilizan, caracterizado por que dichos materiales nanocompuestos tridimensionales pueden obtenerse a partir de soluciones acuosas de al menos un polisacárido liótrofo, termótrofo o termo-liótrofo, neutro o aniónico, y de un nanocompuesto a base de metal que consiste en al menos un polisacárido catiónico ramificado que atrapa las nanopartículas metálicas, en el que estas soluciones acuosas tienen una fuerza iónica de al menos 50 mM y no superior a 350 mM y un pH de al menos de 7, y en el que estas soluciones acuosas se tratan con agentes gelificantes físicos o químicos capaces de causar la gelificación de los polisacáridos liótrofos, termótrofos o termo-liótrofos, neutros o aniónicos. Estas soluciones acuosas tienen preferiblemente una osmolaridad comprendida en el intervalo de 250 a 300mM.

30

[0017] Por lo tanto, los materiales nanocompuestos tridimensionales que pueden obtenerse con tal método de preparación son aún un objeto de la invención.

45

[0018] Además, los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con la invención mostraron tener una fuerte actividad antimicrobiana de amplio espectro y ningún efecto citotóxico.

50

[0019] Por lo tanto, es un objeto adicional de la invención el uso de estos materiales nanocompuestos tridimensionales en el campo biomédico, en particular para aplicaciones antimicrobianas. De hecho, los materiales compuestos tridimensionales objeto de la presente invención, prometen aplicaciones útiles como biomateriales, tanto en el campo terapéutico dermatológico (por ejemplo, ulceraciones cutáneas vasculares-metabólicas) como ortopédico (por ejemplo, revestimientos de prótesis óseas), dental (tratamiento de infecciones de patógenos periodontales), cardiológico, urológico (revestimientos de endoprótesis) y de la cirugía general.

55

Breve descripción de las figuras

[0020]

Figura 1: la figura muestra un material nanocompuesto tridimensional en forma de hidrogel que comprende un nanocompuesto a base de metal formado por un derivado de quitosano con nanopartículas de plata a base de lactosa (C: en lo sucesivo en el presente documento denominado como Chitlac: número de registro CAS 85941-43-1) (nAg) en una matriz de alginato (A) (gel AC-nAg). La composición es: Chitlac al 0,2 % (p/v), alginato al 1,5 % (p/v), AgNO_3 0,5 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,25 mM, tampón Hepes 10 mM, CaCO_3 30 mM, GDL 60 mM (D-glucono- δ -lactona). La preparación del hidrogel se describe en el ejemplo 8.

Figura 2: La figura muestra un material nanocompuesto tridimensional en forma de hidrogel que comprende un nanocompuesto a base de metal formado por nanopartículas de oro a base de Chitlac (nAu) en una matriz de Alginato (gel AC-nAu). La composición es: Chitlac al 0,2 % (p/v), alginato al 1,5 % (p/v), HAuCl_4 0,5 mM, tampón Hepes 10 mM, CaCO_3 30 mM, GDL 60 mM. La preparación se describe en el ejemplo 9.

Figura 3: La figura muestra microesferas de gel AC-nAg de material nanocompuesto tridimensional (Chitlac al 0,2 % (p/v), alginato al 1,5 % (p/v), AgNO_3 0,5 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,25 mM, tampón Hepes 10 mM, CaCO_3 30 mM, GDL 60 mM). La preparación se describe en el ejemplo 13.

Figura 4: La figura muestra un ensayo de crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 en el material nanocompuesto tridimensional en forma de hidrogel de Alginato-Chitlac (gel AC, ejemplo 6, a la izquierda) en comparación con un material nanocompuesto tridimensional en forma de hidrogel de Alginato-Chitlac-nAg (gel AC-nAg, ejemplo 8, a la derecha).

Figura 5: La figura muestra un ensayo de recuento de colonias de bacterias de *E. coli* ATCC 25922 en contacto con una suspensión que contiene microesferas AC-nAg de material nanocompuesto tridimensional durante 240 min. La preparación de microesferas se describe en el ejemplo 13. El control se representa por el crecimiento en medio Mueller-Hinton al 20 % (T 0 y 240 min).

Figura 6: La figura muestra un ensayo de crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 en hidrogel de Alginato-Chitlac de material nanocompuesto tridimensional (gel AC, ejemplo 6, a la izquierda) en comparación con un hidrogel de Alginato-Chitlac-nAu de material nanocompuesto tridimensional (gel AC-nAg, ejemplo 9, a la derecha).

Figura 7: La figura muestra un ensayo de citotoxicidad sobre líneas celulares de fibroblasto (NIH-3T3), evaluado como liberación de LDH (deshidrogenasa láctica), de geles AC-nAg de material nanocompuesto tridimensional (ejemplo 8, líneas diagonales) por contacto, y el extracto relacionado después de 24 y 72 horas en un medio a 37 °C. Los controles se representan por i) células adherentes (control, confluentes), ii) células en contacto con gel de Alginato-Chitlac sin nanopartículas de plata (gel AC, ejemplo 6, líneas horizontales), iii) células en contacto con el medio de cultivo líquido mantenido en contacto con el material durante un tiempo determinado (24 horas) (en lo sucesivo aquí denominado como "extracto") de geles de Alginato-Chitlac sin nanopartículas de plata (extracto de gel AC, malla ortogonal).

Figura 8: La figura muestra un ensayo de citotoxicidad (LDH) sobre líneas celulares de osteoblasto (MG63), evaluado como liberación de LDH (deshidrogenasa láctica), de geles AC-nAu de material nanocompuesto tridimensional (ej. 9, Cont. de AC-nAu) por contacto, y el extracto relacionado (Est. AC-nAu) después de 24 y 72 horas en un medio a 37 °C. Los controles se representan por células adherentes (adhesión), células en contacto con geles de Alginato-Chitlac sin nanopartículas metálicas (ejemplo 6, Cont. de AC), extracto de geles de Alginato-Chitlac sin nanopartículas metálicas (Est. de AC), células en contacto con discos de poliestireno (PS, control negativo de los sistemas en contacto), células en contacto con discos de poliuretano con ZnDBC (PU, control positivo del sistema en contacto de acuerdo con la Norma ISO 10993-5), células con una solución de Triton (control positivo del extracto).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

[0021] *Estructura tridimensional:* La definición indica para el propósito de la presente solicitud una estructura, tanto hidratada como no hidratada, capaz de mantener la forma y el tamaño cuando no se somete a deformación.

[0022] La estructura tridimensional desvelada en la presente solicitud es un material nanocompuesto formado por una matriz de polisacáridos neutros o aniónicos que comprende un material formado por nanopartículas metálicas dispersadas uniformemente y permanentemente en polisacáridos ramificados policatiónicos descritos en detalle en lo sucesivo en el presente documento. Por lo tanto, en primera instancia, la definición de "nanocompuesto tridimensional" se utiliza para indicar el material nanocompuesto de la invención.

[0023] *Hidrogel:* Generalmente, el término "hidrogel" indica estructuras semisólidas tridimensionales altamente hidratadas capaces de mantener la forma y el tamaño cuando no se someten a deformación. Pueden obtenerse a partir de soluciones semi-diluidas de polisacáridos adecuadamente reticulados.

[0024] En la siguiente descripción, también se pueden usar "hidrogeles nanocompuestos" para indicar, cuando se hidratan, las estructuras nanocompuestas tridimensionales de la invención como se han definido previamente.

5 [0025] *Nanocompuesto*: Generalmente, el término "nanocompuesto" indica un sistema que consiste en partículas con tamaño nanométrico (cargas) a través de un material macroscópico (matriz). Al ser la invención un nanocompuesto tridimensional derivado de la inclusión en una matriz polisacárida neutra o aniónica de un material nanocompuesto (por ejemplo, nanopartículas metálicas dispersadas uniformemente y permanentemente en polisacáridos catiónicos ramificados), este último material se indica en el presente documento principalmente como
10 "nanocompuesto a base de metal". En particular, el nanocompuesto a base de metal consiste en nanopartículas metálicas formadas por la reducción de iones metálicos por o en derivados polisacáridos alditólicos o aldónicos de quitosano. Por lo tanto, en la siguiente descripción, además de "nanocompuesto a base de metal", se utiliza "nanocompuesto a base de nanopartículas metálicas" con referencia a este material.

15 [0026] *Solución coloidal (o coloide)*: Sistema en el que las partículas con tamaños de 1 y 1.000 nm se dispersan en un medio de disolvente continuo.

[0027] *Gelificación "in situ"*: Método de gelificación en el que hay una liberación controlada del agente gelificante (por ejemplo, ión Ca^{2+} para alginato). Esto se logra utilizando una forma inactivada del agente gelificante (por ejemplo, CaCO_3) que después se libera tras la adición de un segundo componente (por ejemplo, glucono- δ -lactona, GDL).
20

[0028] Los objetos y ventajas del material nanocompuesto tridimensional que se describe en la presente invención se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada donde se describirán, a modo de ejemplo no
25 limitante de la invención, algunos ejemplos de preparación de nanocompuestos tridimensionales y su caracterización biológica para evaluar la actividad antibacteriana y la citotoxicidad.

Descripción

30 [0029] Para los objetos perseguidos, se ha abordado el aspecto relacionado con la preparación y caracterización de un sistema nanocompuesto basado en polisacáridos en el que se explotan las propiedades relacionadas con una nanoescala de nanopartículas metálicas. De acuerdo con la invención, los materiales nanocompuestos tridimensionales están formados a partir de una matriz polimérica que consiste en una composición de al menos un polisacárido liótrofo, termótrofo o termo-liótrofo, neutro o aniónico, y un nanocompuesto a base de metal que
35 consiste en al menos un polisacárido catiónico ramificado que atrapa nanopartículas metálicas uniformemente dispersas y estabilizadas en tal polisacárido catiónico ramificado. Los polisacáridos catiónicos ramificados tienen una doble función en el material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la invención: i) principalmente por un lado, atrapando y estabilizando adecuadamente las nanopartículas metálicas, y ii) adicionalmente, por otro lado, contribuyendo en la formación de la matriz, que es sustancialmente una composición de polisacáridos (por ejemplo,
40 al menos un polisacárido liótrofo, termótrofo o termo-liótrofo, neutro o aniónico, y al menos un polisacárido catiónico ramificado), en la medida en que la matriz tridimensional se debe principalmente a la capacidad de los polisacáridos neutros o aniónicos para formar geles con agentes gelificantes apropiados. Por lo tanto, tal composición de polisacáridos está en una posible realización binaria y formada por un polisacárido neutro o ácido y un polisacárido catiónico ramificado.

45 [0030] Los polisacáridos neutros o ácidos útiles para el propósito de la invención son: a) polisacáridos ácidos, capaces de formar geles liótropos, seleccionados del grupo que consiste en alginatos, pectatos, pectinatos; b) polisacáridos neutros capaces de dar lugar a geles termótropos y, en este caso, se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en agarosa, escleroglucano, esquizofilano, curdlán; c) polisacáridos ácidos capaces de dar lugar
50 a geles termo-liótropos y, en este caso, se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en sulfato de agarosa, I- y K-carragenano, sulfato de celulosa, goma gellan, goma rhamsan, goma whelan (también conocida como goma de welan), goma xantana.

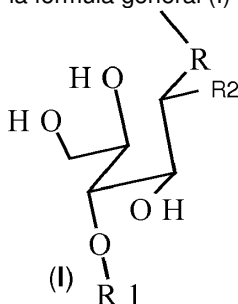
[0031] El peso molecular medio (PM) de los polisacáridos neutros o ácidos puede ser de hasta 2.000 kDa y
55 preferiblemente de 100 kDa a 1.000 kDa y se usan más preferiblemente pesos moleculares medios de 200 kDa.

[0032] Como se conoce bien, estos polisacáridos neutros o aniónicos tienen la característica de formar estructuras tridimensionales (tipo gel o hidrogeles, cuando se hidratan), en las condiciones adecuadas. De hecho, el aspecto relacionado con la formación de hidrogel está sustancialmente relacionado con la capacidad de estos polisacáridos

neutros o ácidos para formar instantáneamente hidrogeles cuando se ponen en contacto con soluciones de iones para polisacáridos liótropos, o con soluciones enfriadas para polisacáridos termótropos. En el caso de los polisacáridos termo-liótropos ácidos, los agentes de gelificación pueden ser tanto físicos como químicos y, por lo tanto, ser iones o estar a las temperaturas apropiadas o ambos.

5

[0033] Por el contrario, el aspecto relacionado con la formación y el transporte de nanopartículas metálicas está sustancialmente relacionado con el segundo componente polisacárido, es decir, los polisacáridos catiónicos ramificados. Para los fines de la presente invención, se trata de derivados alditólicos o aldónicos ramificados de quitosano, en los que las unidades de D-Glucosamina que forman la cadena lineal de quitosano unen, por medio del grupo funcional -NH del átomo de carbono C2, residuos mono- u oligo-sacáridos de polioles alditólicos o aldónicos, iguales o diferentes entre sí, representados por la fórmula general (I)

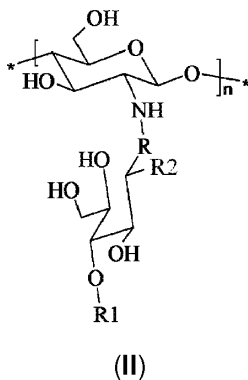


donde:

15

- R es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CO}-$;
- R_1 es hidrógeno o un monosacárido, o un oligosacárido;
- R_2 es $-\text{OH}$ o $-\text{NHCOCH}_3$.

[0034] Para los fines representativos, las unidades de D-Glucosamina sustituidas con residuos mono u oligosacáridos de polioles alditólicos o aldónicos en los derivados ramificados de quitosano se representan por la fórmula general (II), donde "n" se refiere al número total de unidades de D-Glucosamina que constituyen una cadena de quitosano lineal:



25

[0035] Para los fines de la presente invención, en los derivados ramificados preferidos de quitosano, cuando R_1 es un monosacárido, dicho monosacárido se selecciona del grupo que consiste en galactosa, glucosa, manosa, N-acetil glucosamina, y N-acetil galactosamina, y, cuando R_1 es un oligosacárido, dicho oligosacárido puede comprender 2 unidades glicosídicas.

30

[0036] Los residuos alditólicos o aldónicos mono u oligosacáridos de fórmula general (I) son preferiblemente mono u oligosacáridos que comprenden de 1 a 3 unidades glicosídicas y, de acuerdo con un aspecto más preferido, estos residuos de polioles alditólicos o aldónicos son residuos de oligosacáridos que comprenden de 2 a 3 unidades glicosídicas y aún más preferiblemente, se seleccionan del grupo de residuos de oligosacáridos que consisten en lactosa, celobiosa, celotriosa, maltosa, maltotriosa, quitobiosa, quitotriosa, manobiosa, así como de sus ácidos aldónicos correspondientes. Para los fines de la presente invención, el derivado oligosacárido más preferido de

35

quitosano es el derivado con lactosa (Chitlac; número de registro CAS 85941-43-1). Además, para dispersar uniformemente y estabilizar las nanopartículas metálicas, el grado de sustitución química de los grupos amino de quitosano con estos mono u oligosacáridos de fórmula general (I) debe ser de al menos el 40 %. El grado de sustitución de los grupos amino de quitosano con dichos mono u oligosacáridos está preferiblemente comprendido en el intervalo del 50 % al 80 %, y más preferiblemente es del 70 %.

[0037] El peso molecular medio (en lo sucesivo en el presente documento denominado PM) del quitosano útil para obtener los derivados oligosacáridos mencionados es de hasta 1.500 kDa y está comprendido preferiblemente en el intervalo de 400 kDa a 700 kDa.

[0038] Las nanopartículas metálicas incorporadas en la matriz polimérica que consisten en estos derivados ramificados mono u oligosacáridos de quitosano están hechas de metales seleccionados preferiblemente de plata, oro, platino, paladio, cobre, cinc, níquel, y mezclas de los mismos.

[0039] Las nanopartículas incluidas en la matriz polimérica que consisten en derivados ramificados mono u oligosacáridos de quitosano tienen un tamaño en el intervalo de 5 nm a 150, y en particular, un tamaño de nanopartícula metálica medio controlado entre 30 y 50 nm.

[0040] Una característica esencial de estas nanopartículas es que estas nanopartículas son en su mayoría metales en su forma reducida, además, sin excluir la presencia residual de grupos de pocos átomos con un carácter iónico, y que en su dispersión/estabilización en la matriz polisacárida, están implicadas cadenas laterales mono u oligosacáridas próximas a los grupos amino del propio quitosano.

[0041] Sin desear unirse a estas, las relaciones preferidas de matriz polisacárida catiónica y metales se refieren a nanocompuestos a base de metal en forma de soluciones coloidales, aunque dicho nanocompuesto a base de metal pueden estar también en forma de películas o polvos deshidratados, e incluso se dializan para eliminar los contraiones residuales de la preparación de los propios materiales. En los nanocompuestos a base de metal en forma de soluciones coloidales acuosas, la relación de la concentración del polisacárido (expresada como % p/v) sobre la concentración de la sal metálica de partida (expresada como molaridad) es de 0,0025 a 20 y preferiblemente es de 0,2.

[0042] Por lo tanto, la masa metálica expresada en mg, que puede incorporarse por gramo de polisacárido catiónico, puede ser de 3.000 mg/g a 0,3 mg/g y preferiblemente es 50 mg del metal incorporado por gramo de polisacárido.

[0043] Tal componente de los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con la invención puede prepararse en las condiciones apropiadas con soluciones acuosas de polisacáridos básicos en presencia o ausencia de agentes reductores exógenos.

[0044] El método para preparar este componente de los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con la invención comprende al menos:

- a) preparar soluciones acuosas de polisacáridos catiónicos ramificados en una concentración de hasta el 2 % (p/v);
- b) preparar soluciones acuosas de sales metálicas en una concentración de 0,1 mM a 20 mM;
- c) añadir estas soluciones salinas a las soluciones de polisacáridos y mezclar hasta obtener soluciones coloidales donde las nanopartículas metálicas se dispersan homogéneamente.

[0045] Opcionalmente se añade un agente reductor a las soluciones coloidales obtenidas.

[0046] La formación de las nanopartículas metálicas en presencia de polisacáridos catiónicos ramificados produce un sistema de nanopartículas de metal excepcionalmente bien dispersado y estabilizado, evitando la tendencia bien conocida de la nanopartícula de metal preformada a dar grandes grupos de aglomerados en solución, lo que generalmente conduce a perder los beneficios relacionados con la escala nanométrica.

[0047] En sus características generales, el método de preparación del nanocompuesto a base de metal es como se indica a continuación: se preparan soluciones acuosas de estos derivados ramificados de quitosano con mono u oligosacáridos a diferentes concentraciones (hasta el 2 % (p/v), preferiblemente en el intervalo del 0,05 % (p/v) al 1 % (p/v) y más preferentemente del 0,2 % Las soluciones de polisacárido se mezclan entonces con soluciones de

sales metálicas elegidas entre plata, oro, platino, paladio, cobre, cinc, níquel, preferiblemente seleccionadas entre cloruros, percloratos y nitratos (por ejemplo, AgNO_3 , HAuCl_4 , CuSO_4 , ZnCl_2 , NiCl_2), para obtener concentraciones finales de estos metales de 0,1 mM a 20 mM, más preferiblemente de 1 mM a 14 mM, y aún más preferiblemente de 1 mM. Se pueden añadir opcionalmente agentes reductores conocidos, preferiblemente seleccionados de entre ácido ascórbico, citrato sódico, borohidruro sódico y cianoborohidruro sódico a las soluciones para obtener nanopartículas en estado metálico. El agente reductor se añade a concentraciones de 0,05 mM a 10 mM, y preferiblemente la concentración es de 0,5 mM.

[0048] Sin embargo, se descubrió que de otro modo para otros sistemas poliméricos, los nanocompuestos a base de metal formados a partir de derivados ramificados de quitosano con mono u oligosacáridos y nanopartículas metálicas también se pueden preparar en ausencia de agentes reductores, ya que las cadenas mono u oligosacáridas actúan como agente reductor de iones metálicos *per se*, y permiten formar *in situ* nanopartículas dispersas en la matriz polimérica. En este caso, las nanopartículas metálicas pueden obtenerse mezclando simplemente las soluciones derivadas de quitosano con soluciones salinas del metal seleccionado a concentraciones apropiadas. También en este caso, las concentraciones de polisacárido y sal metálica son como se ha indicado previamente.

[0049] Sin embargo, en ambos casos debido a las propiedades químicas y físico-químicas de los átomos de nitrógeno y los sustituyentes laterales existentes en el derivado ramificado mono u oligosacárido del quitosano, los iones metálicos interaccionan con macromoléculas mediante interacciones de coordinación, mientras que la presencia de las cadenas laterales de mono u oligosacáridos, por ejemplo lactosa, ofrece una impedancia estérica eficaz para obstaculizar la tendencia natural de las nanopartículas a agregarse. La posterior reducción de iones, ya sea causada por un agente reductor exógeno o por las cadenas mono u oligosacáridas de los derivados ramificados de quitosano, conduce a la formación de nanopartículas estabilizadas por cadenas polisacáridas.

[0050] En ambos casos, la relación de masa de plata que puede incorporarse y la del polisacárido, que se indica como mg por gramo, es como se ha indicado previamente. Inesperadamente, se descubrió que la mezcla en soluciones acuosas del componente polimérico que consiste en los polisacáridos neutros o ácidos que se han mencionado anteriormente, y en particular los alginatos, y el componente polimérico polisacárido básico, es decir, los derivados ramificados del quitosano con los polioles alditólicos o aldónicos de fórmula general (I), que comprenden las nanopartículas metálicas, que ya son un material nanocompuesto en la naturaleza (por ejemplo, el nanocompuesto a base de metal), los materiales nanocompuestos obtenidos son matrices tridimensionales o hidrogeles estables y no son coacervados en la naturaleza, a pesar de la presencia de nanopartículas metálicas, así como las nanopartículas permanecen uniformemente dispersas en los derivados ramificados de quitosano.

[0051] De hecho, la formación de hidrogel o matriz tridimensional de acuerdo con la invención se puede obtener mezclando los dos componentes (por ejemplo, polisacáridos neutros o ácidos y el nanocompuesto metálico) en soluciones acuosas que tienen las características apropiadas por medio de un tratamiento posterior del mismo con agentes adecuados capaces de gelificar el polisacárido aniónico o neutro.

[0052] En particular, los materiales nanocompuestos tridimensionales que comprenden una matriz polimérica que consiste en al menos un polisacárido neutro o aniónico, liótrofo, termótrofo o termo-liótrofo, y un nanocompuesto a base de metal que consiste en al menos un polisacárido catiónico ramificado que atrapa nanopartículas metálicas uniformemente dispersas y estabilizadas, pueden obtenerse a partir de soluciones acuosas de los dos componentes que tienen las soluciones con una fuerza iónica al menos de 50 mM y no superior a 350 mM y un pH de al menos 7, y tratando estas soluciones con agentes gelificantes químicos o físicos capaces de gelificar los polisacáridos neutros o aniónicos, liótropos, termótropos o termo-liótropos.

[0053] Las condiciones preferidas (concentraciones sustanciales, pH, fuerza iónica) para obtener las matrices o hidrogeles tridimensionales de estos dos componentes son típicamente soluciones acuosas que tienen un pH en un intervalo fisiológico, y en particular entre 7 y 8, y más preferiblemente el pH es de 7,4, y una osmolaridad de 250 a 300 mM, con una fuerza iónica de 50 mM a 350 mM, y preferentemente de 150 mM, preferiblemente obtenidas añadiendo NaCl a concentraciones de 0,05 M a 0,35 M, y más preferiblemente de 0,15 M.

[0054] Los agentes gelificantes se pueden seleccionar dependiendo del tipo de polisacárido aniónico liótrofo de iones monovalentes, bivalentes o trivalentes adecuados, y para los polisacáridos termótropos entre temperaturas no superiores a 50 °C o no inferiores a 10 °C. Como se sabe, para los polisacáridos termo-liótropos, los agentes de gelificación pueden ser tanto agentes químicos, tales como iones, como agentes físicos, tales como la temperatura. La elección entre los dos tipos de agentes gelificantes depende sustancialmente, como se conoce bien en la técnica,

del polisacárido termo-liótropo ácido a gelificar.

[0055] Para polisacáridos tales como alginato y pectato, estos iones son iones alcalinotérreos, excluyendo magnesio, y metales de transición, y preferiblemente se seleccionan de entre calcio, bario, estroncio, plomo, cobre, manganeso y mezclas de los mismos, o son iones de tierras raras y preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste en gadolinio, terbio, europio y mezclas de los mismos.

[0056] Las concentraciones de la solución acuosa de estos iones adaptados para la gelificación son superiores a 10 mM y preferiblemente de 10 mM a 100 mM y más preferiblemente de 50 mM. La solución gelificante contiene preferiblemente una concentración de CaCl_2 de 50 mM y una fuerza iónica de 0,15 M.

[0057] En el caso de los carragenanos, pueden usarse iones alcalinos elegidos preferiblemente del grupo que consiste en potasio, rubidio y cesio, a concentraciones no inferiores a 50 mM y preferiblemente de 50 mM a 200 mM y más preferiblemente de 0,1 M.

[0058] En el caso de soluciones polisacáridas, que conducen a hidrogeles termótropos, tales como por ejemplo agarosa, la preparación de hidrogeles se realiza enfriando por debajo de la temperatura de formación del gel. Las soluciones polisacáridas se preparan a una temperatura por encima de la temperatura a la que tiene lugar la formación de hidrogel por el polisacárido termótropo. A esta temperatura, el polisacárido termótropo no forma hidrogeles. La temperatura a la que se preparan las soluciones polisacáridas, preferiblemente está en el intervalo de 50 °C a 30 °C, y más preferiblemente es de 37 °C. La formación de hidrogel se produce por goteo de la solución polisacárida en un baño de gelificación enfriado a una temperatura por debajo de la temperatura de formación del gel. Esta temperatura está preferiblemente en el intervalo de 10 °C a 40 °C y más preferiblemente es de 20 °C.

[0059] Para los fines de la presente invención, las mezclas al menos binarias de polisacárido neutro o aniónico y de polisacárido básico ramificado que comprenden las nanopartículas metálicas tienen concentraciones poliméricas totales de polisacárido neutro o aniónico de hasta el 4 % (p/v). Estas concentraciones poliméricas totales están preferiblemente en el intervalo de 1,5 % a 3 % (p/v) y más preferiblemente son del 2 % (p/v).

[0060] Para los fines de la presente invención, las relaciones en peso de polisacáridos ácidos y polisacáridos catiónicos, en los que las nanopartículas metálicas están atrapadas, son de 8:1 a 1:1 (polisacárido neutro o aniónico:polisacárido catiónico), y preferiblemente de 8:1 a 5:1, y más preferiblemente de 7,5:1. Por lo tanto, los materiales nanocompuestos tridimensionales de la invención pueden obtenerse de acuerdo con un método de preparación que comprende al menos las siguientes etapas:

i. preparar una solución acuosa de una mezcla de al menos un polisacárido neutro o aniónico, liótropo, termótropo o termo-liótropo y de un nanocompuesto a base de metal que consiste en al menos un derivado mono u oligosacárido de quitosano que atrapa las nanopartículas metálicas (preparadas como se ha descrito previamente), teniendo dicha solución acuosa una fuerza iónica de al menos 50 mM y no superior a 350 mM, y al menos un pH de 7;

ii. gelificar el polisacárido neutro o aniónico, liótropo, termótropo o termo-liótropo, tratando la solución acuosa de la mezcla preparada en la etapa anterior por medio de agentes de gelificación químicos o físicos adecuados.

[0061] En particular, esta última etapa puede realizarse por goteo a través de una aguja en una solución que contiene el ión de reticulación para los polisacáridos aniónicos liótropos, o en una solución a una temperatura adecuada para los polisacáridos termótropos, o mediante gelificación "*in situ*". Para los polisacáridos termo-liótropos pueden emplearse tanto soluciones iónicas como soluciones a las temperaturas apropiadas para el proceso de gelificación

[0062] Con el método que se ha descrito anteriormente, se obtienen materiales nanocompuestos, en los que la matriz polimérica hecha de polisacáridos es tridimensional y en forma de hidrogel o no hidratada si se somete a procesos de deshidratación posteriores. Además, estas matrices pueden adoptar diversas formas como cilindros, microesferas, discos, películas secas, polvos, o pueden extraerse para producir fibras.

[0063] En el caso del alginato, los cilindros se pueden preparar añadiendo un ión reticulante en la forma inactiva, por ejemplo CaCO_3 o el complejo Ca-EDTA, a la solución polisacárida. A continuación, se añade una sustancia hidrolizante lentamente, tal como, por ejemplo, GDL (D-glucono- δ -lactona). Por ejemplo, esta suspensión se transfiere dentro de los recipientes en forma de cilindro o discoide y se mantiene durante 24 h. Después, los cilindros

de gel de las soluciones polisacáridas se extraen de los recipientes. La formación *in situ* de los cilindros se debe a la liberación de iones de calcio.

[0064] Para ensayar la actividad antimicrobiana de nanocompuestos tridimensionales de la invención, se realizan ensayos de crecimiento bacteriano sobre un soporte semisólido y un ensayo de recuento de colonias bacterianas en presencia de microesferas de nanocompuestos tridimensionales; se ha mostrado que, debido a la presencia de nanopartículas de metal, las bacterias no crecen ni en dicha superficie de gel ni en una suspensión puesta en contacto con las microesferas de gel de nanocompuestos tridimensionales, subrayando así una fuerte actividad antibacteriana.

[0065] Los ensayos de citotoxicidad en diferentes líneas celulares eucariotas demuestran que estos geles nanocompuestos tridimensionales no son citotóxicos, ni siquiera manteniendo un efecto bactericida eficaz.

[0066] A título ilustrativo y no limitativo, se describen en lo sucesivo en el presente documento la preparación no hidratada de hidrogel o matriz 3D de acuerdo con la invención, así como la actividad biológica de tipo antimicrobiano.

Preparación de hidrogenes de nanocompuesto tridimensional a partir de una solución de un polisacárido aniónico y un nanocompuesto a base de metal que consiste en un derivado oligosacárido de quitosano con nanopartículas metálicas

Ejemplo 1: Síntesis de derivados de quitosano con lactosa (en lo sucesivo en el presente documento "Chitlac")

[0067] Se disuelve quitosano (1.5 g, grado de acetilación al 11 %) en 110 ml de una solución de metanol (55 ml) y tampón de ácido acético al 1 %, pH 4,5 (55 ml). Se añaden 60 ml de una solución de metanol (30 ml) y tampón de ácido acético al 1 %, pH 4,5 (30 ml) que contiene lactosa (2,2 g) y cianoborohidruro sódico (900 mg). La mezcla se deja agitar durante 24 horas, se transfiere a tubos de diálisis (*corte* 12.000 Da) y se dializa contra NaCl 0,1 M (2 cambios) y contra agua desionizada hasta que se consigue una conductividad de 4 μ S a 4 °C. Finalmente, la solución se filtra en filtros Millipore de 0,45 μ m y se liofiliza.

Ejemplo 2: Síntesis de derivados quitosano con celobiosa (en lo sucesivo en el presente documento "Chitcel")

[0068] Se disolvió quitosano (1,5 g, grado de acetilación al 11 %) en 110 ml de una solución de metanol (55 ml) y tampón de ácido acético al 1 %, pH 4,5 (55 ml). Se añaden 60 ml de una solución de metanol (30 ml) y tampón de ácido acético al 1 %, pH 4,5 (30 ml) que contiene celobiosa (2,2 g) y cianoborohidruro sódico (900 mg). La mezcla se deja agitar durante 24 horas, se transfiere a tubos de diálisis (*corte* 12.000 Da) y se dializa contra NaCl 0,1 M (2 cambios) y contra agua desionizada hasta que se consigue una conductividad de 4 μ S a 4 °C. Finalmente, la solución se filtra en filtros Millipore de 0,45 μ m y se liofiliza.

Ejemplo 3: Preparación de nanocompuesto a base de metal con nanopartículas de plata en Chitlac.

[0069] La nanopartículas se obtienen tras la reducción de iones metálicos con ácido ascórbico en soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v). Después, las soluciones de Chitlac se mezclan con soluciones de nitrato de plata, para obtener una concentración final de AgNO₃ de 1 mM. Después, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,5 mM.

Ejemplo 4: Preparación del nanocompuesto a base de metal con nanopartículas de plata en Chitcel

[0070] La nanopartículas se obtienen tras la reducción de iones metálicos con ácido ascórbico en soluciones de Chitcel de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitcel a una concentración del 0,4 % (p/v). Después, las soluciones de Chitcel se mezclan con soluciones de nitrato de plata, para obtener una concentración final de AgNO₃ de 1 mM. Después, se añade una solución de ácido ascórbico, para obtener una concentración final igual a 0,5 mM.

Ejemplo 5: Preparación de nanocompuesto a base de metal con nanopartículas de oro en Chitlac

[0071] La nanopartículas se obtienen tras la reducción de iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v).

Después, la solución de Chitlac se mezcla con un ácido tetracloroáurico para obtener una concentración final de HAuCl_4 de 1 mM.

Ejemplo 6: Preparación de hidrogeles cilíndricos en base a alginato-Chitlac y por medio de gelificación *"in situ"*

5 **[0072]** A una solución de Chitlac se le añade una solución de alginato en presencia de NaCl y tampón Hepes, para obtener las siguientes concentraciones finales: Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. Después, se añade una solución de CaCO_3 (concentración 30 mM) y posteriormente se
10 añade D-glucono- δ -lactona (GDL) ($[\text{GDL}]/[\text{Ca}^{2+}] = 2$) para permitir una gelificación lenta. Para los ensayos antibacterianos, se añade medio Mueller-Hinton al 20 % (4,2 g/l). La solución final se transfiere a cilindros de plástico dimensionados según se desee (por ejemplo, 16 mM (0) x 18 mM (h)) y se dejan gelificar en la oscuridad durante 24 horas.

15 **Ejemplo 7:** Preparación de hidrogeles nanocompuestos tridimensionales basados en alginato-Chitlac y nanopartículas metálicas por medio de gelificación *"in situ"*

[0073] Se añade una solución de Chitlac con nanopartículas metálicas preparada de acuerdo con el ejemplo 3 a una solución de alginato (concentraciones de alginato finales de hasta el 4 % (p/v) y preferiblemente en el intervalo del 1 % (p/v) al 2 % (p/v)) en presencia de CaCO_3 (concentración final de hasta 40 mM y preferiblemente de 15 mM a 30 mM) y después se añade D-glucono- δ -lactona (GDL) ($[\text{GDL}]/[\text{Ca}^{2+}] = 2$) para permitir una gelificación lenta. Para los ensayos antibacterianos, se añade medio Mueller-Hinton final al 20 % (4,2 g/l). **Ejemplo 8:** Preparación de hidrogeles nanocompuestos tridimensionales cilíndricos basados en alginato-Chitlac y nanopartículas de plata por medio de gelificación *"in situ"* A una solución de Chitlac con nanopartículas de plata preparadas de acuerdo con el ejemplo 3, se le añade una solución de alginato en presencia de NaCl y tampón Hepes para obtener las siguientes
25 concentraciones finales: Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), AgNO_3 0,5 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,25 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. Después, se añade una solución de CaCO_3 (concentración 30 mM) y posteriormente se añade D-glucono- δ -lactona ($[\text{GDL}]/[\text{Ca}^{2+}] = 2$) para permitir una gelificación lenta. Para los ensayos antibacterianos, se añade medio Mueller-Hinton al 20 % (4,2 g/l). La solución final se transfiere a cilindros de plástico dimensionados según se desee (por ejemplo, 16 mM (0) x 18 mM (h)) y se dejan gelificar en la oscuridad
30 durante 24 horas.

[0074] Cabe mencionar que la agregación de partículas o la separación de fases poliméricas están ausentes tanto durante como después de la gelificación. Como se observa en la figura 1, el material nanocompuesto tridimensional obtenido es un hidrogel de color amarillo-naranja (el color varía dependiendo de la concentración de plata).

35 **Ejemplo 9:** Preparación de hidrogeles tridimensionales cilíndricos basados en alginato-Chitlac y nanopartículas de oro por medio de gelificación *"in situ"*

[0075] A una solución de Chitlac con nanopartículas de oro preparada de acuerdo con el ejemplo 5, se le añade una solución de alginato en presencia de NaCl y tampón Hepes, para obtener las siguientes concentraciones finales: Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), HAuCl_4 0,5 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. Después, se añade una solución de CaCO_3 (concentración 30 mM) y posteriormente se añade D-glucono- δ -lactona (GDL) ($[\text{GDL}]/[\text{Ca}^{2+}] = 2$) para permitir una gelificación lenta. Para los ensayos antibacterianos, se añade medio Mueller-Hinton al 20 % (4,2 g/l). La solución final se transfiere a cilindros de plástico dimensionados según se desee
45 (por ejemplo, 16 mM (0) x 18 mM (h)) y se dejan gelificar en la oscuridad durante 24 horas.

[0076] Una muestra de hidrogel nanocompuesto tridimensional obtenido se muestra en la figura 2.

50 **Ejemplo 10:** Preparación de esferas nanocompuestas tridimensionales por medio de una jeringa de soluciones de alginato-Chitlac (en manitol) con nanopartículas de plata.

[0077] Se preparó una solución polisacárida con las siguientes concentraciones finales. Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), AgNO_3 0,5 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,25 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. La solución se añadió por goteo usando una jeringa dotada de una aguja 23G, en una solución que contenía CaCl_2 50 mM y manitol
55 0,15 M, tampón Hepes 10 mM (pH 7,4) en agitación por medio de una varilla magnética. Las esferas se mantuvieron en agitación en el baño de gelificación durante 10 min antes de eliminarse y lavarse con agua desionizada.

Ejemplo 11: Preparación de esferas nanocompuestas tridimensionales por medio de una jeringa de soluciones de alginato-Chitlac (en NaCl) con nanopartículas de plat

[0078] Se preparó una solución polisacárida con las siguientes concentraciones finales. Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), AgNO_3 0,5 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,25 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. La solución se añadió por goteo usando una jeringa dotada de una aguja 23G, en una solución que contenía CaCl_2 50 mM y manitol 0,15 M, tampón Hepes 10 mM (pH 7,4) en agitación por medio de una varilla magnética. Las esferas se mantuvieron en agitación en el baño de gelificación durante 10 min antes de eliminarse y lavarse con agua desionizada.

Ejemplo 12: Preparación de esferas nanocompuestas tridimensionales por medio de una jeringa de soluciones de alginato-Chitlac con nanopartículas de oro.

[0079] Se preparó una solución polisacárida con las siguientes concentraciones finales. Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), HAuCl_4 0,5 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. La solución se añadió por goteo usando una jeringa dotada de una aguja 23G, en una solución que contenía CaCl_2 50 mM y manitol 0,15 M (baño de gelificación) en agitación por medio de una varilla magnética. Las esferas se mantuvieron en agitación en el baño de gelificación durante 10 min antes de eliminarse y lavarse con agua desionizada.

Ejemplo 13: Preparación de microesferas nanocompuestas tridimensionales por medio de un generador de perlas electrostático a partir de soluciones de alginato-Chitlac con nanopartículas de plata.

[0080] Se preparó una solución polisacárida con las siguientes concentraciones finales. Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), AgNO_3 0,5 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,25 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. La solución se añadió por goteo en un baño de gelificación que contenía CaCl_2 50 mM y manitol 0,15 mM en agitación por medio de una varilla magnética. El tamaño de la microesfera se controla usando un generador electrostático, que permite actuar sobre la tensión superficial de las gotas para reducir el tamaño de las mismas. Las condiciones empleadas fueron típicamente: tensión 5 kV, diámetro interno de la aguja 0,7 mm, distancia entre el baño de gelificación y la aguja 4 cm, caudal de la solución polimérica binaria 10 ml/min. Las microesferas se dejaron en la solución gelificante en agitación durante 10 min antes de eliminarse y lavarse con agua desionizada.

[0081] Las muestras de microesferas nanocompuestas tridimensionales obtenidas se muestran en la figura 3.

Ejemplo 14: Preparación de microesferas nanocompuestas tridimensionales por medio de un generador de perlas electrostático a partir de soluciones de alginato-Chitlac con nanopartículas de oro

[0082] Se preparó una solución polisacárida con las siguientes concentraciones finales: Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), HAuCl_4 0,5 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. La solución se añadió por goteo en un baño de gelificación que contenía CaCl_2 50 mM y manitol 0,15 mM en agitación por medio de una varilla magnética.

[0083] El tamaño de la microesfera se controla usando un generador de perlas electrostático, que permite actuar sobre la tensión superficial de las gotas para reducir el tamaño de las mismas. Las condiciones empleadas son típicamente: tensión 5 kV, diámetro interno de la aguja 0,7 mm, distancia entre el baño de gelificación y la aguja 4 cm, caudal de la solución polimérica binaria 10 ml/min. La microesferas se dejan en la solución gelificante en agitación durante 10 min antes de eliminarse y lavarse con agua desionizada.

Ejemplo 15: Preparación de hidrogeles nanocompuestos tridimensionales con una alta relación de superficie/volumen en base a alginato-Chitlac y nanopartículas de plata por medio de gelificación *"in situ"*.

[0084] A una solución de Chitlac con nanopartículas de plata preparadas de acuerdo con el ejemplo 3, se le añade una solución de alginato en presencia de NaCl y tampón Hepes para obtener las siguientes concentraciones finales: Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), AgNO_3 0,5 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,25 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. Después, se añade una solución de CaCO_3 (concentración 30 mM) y posteriormente se añade D-glucono- δ -lactona (GDL) ($[\text{GDL}]/[\text{Ca}^{2+}] = 2$ para permitir una gelificación lenta. Para los ensayos antibacterianos, se añade medio Mueller-Hinton final al 20 % (4,2 g/l). La solución final se vierte sobre superficies lisas (portaobjetos, placas de Petri, etc.) y se dejan gelificar en la oscuridad durante 24 horas.

Ejemplo 16: Preparación de películas deshidratadas nanocompuestas tridimensionales basadas en alginato-Chitlac y nanopartículas de plata por medio de gelificación *"in situ"*.

[0085] A una solución de Chitlac con nanopartículas de plata preparadas de acuerdo con el ejemplo 3, se le añade una solución de alginato en presencia de NaCl y tampón Hepes para obtener las siguientes concentraciones finales:

Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), AgNO_3 0,5 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,25 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. Después, se añade una solución de CaCO_3 (concentración 30 mM) y posteriormente se añade D-glucono- δ -lactona (GDL) ($[\text{GDL}]/[\text{Ca}^{2+}] = 2$) para permitir una gelificación lenta. Para los ensayos antibacterianos, se añade medio Mueller-Hinton final al 20 % (4,2 g/l). La solución final se vierte sobre superficies lisas (portaobjetos, placas de Petri, etc.) y se dejan gelificar en la oscuridad durante 24 horas. Después, el gel nanocompuesto tridimensional se seca al aire para obtener una película deshidratada sólida de nanocompuesto tridimensional.

Ejemplo 17: Preparación de hidrogeles nanocompuestos tridimensionales con una alta relación de superficie/volumen en base a alginato-Chitlac y nanopartículas de oro por medio de gelificación *"in situ"*

10

[0086] A una solución de Chitlac con nanopartículas de oro preparada de acuerdo con el ejemplo 5, se le añade una solución de alginato en presencia de NaCl y tampón Hepes para obtener las siguientes concentraciones finales: Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), HAuCl_4 0,5 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. Después, se añade una solución de CaCO_3 (concentración 30 mM) y posteriormente se añade D-glucono- δ -lactona (GDL) ($[\text{GDL}]/[\text{Ca}^{2+}] = 2$) para permitir una gelificación lenta. Para los ensayos antibacterianos, se añade medio Mueller-Hinton final al 20 % (4,2 g/l). La solución final se vierte sobre superficies lisas (portaobjetos, placas de Petri, etc.) y se dejan gelificar en la oscuridad durante 24 horas.

Ejemplo 18: Preparación de películas nanocompuestas tridimensionales basadas en alginato-Chitlac y nanopartículas de oro por medio de gelificación *"in situ"*

20

[0087] A una solución de Chitlac con nanopartículas de oro preparada de acuerdo con el ejemplo 5, se le añade una solución de alginato en presencia de NaCl y tampón Hepes para obtener las siguientes concentraciones finales: Alginato al 1,5 % (p/v), Chitlac al 0,2 % (p/v), HAuCl_4 0,5 mM, NaCl 0,15 M, tampón Hepes 0,01 M, pH 7,4. Después, se añade una solución de CaCO_3 (concentración 30 mM) y posteriormente se añade D-glucono- δ -lactona (GDL) ($[\text{GDL}]/[\text{Ca}^{2+}] = 2$) para permitir una gelificación lenta. Para los ensayos antibacterianos, se añade medio Mueller-Hinton final al 20 % (4,2 g/l). La solución final se vierte sobre superficies lisas (portaobjetos, placas de Petri, etc.) y se dejan gelificar en la oscuridad durante 24 horas. Después, el gel nanocompuesto tridimensional se seca al aire para obtener una película sólida nanocompuesta tridimensional.

30

Ejemplo 19: Preparación de microesferas

[0088] Las microesferas de los ejemplos específicos 13 y 14 mencionados anteriormente se prepararon de acuerdo con métodos conocidos y en particular: a) usando jeringas, con las que las soluciones de un polisacárido aniónico y un derivado de nanocompuesto a base de metal mono u oligosacárido de quitosano con nanopartículas metálicas se añaden por goteo en un baño de gelificación adecuado, b) usando un generador de perlas electrostático, desarrollado por el Prof. Gudmund Skjåk-Bræk del Institute of Biotechnology de la NTNU University of Trondheim (Noruega) y descrito por Strand y col., 2002, J. of Microencapsulation 19, 615-630. Tal aparato consiste en un generador electrostático de perlas con una tensión ajustable (hasta 10 kV) por medio de un conmutador adecuado, conectado a un soporte de aguja esterizable en autoclave contenido en un soporte de seguridad de Plexiglás.

[0089] Por medio de un sistema fuera del soporte, que consiste en una jeringa ajustada por una bomba y conectada a un tubo hecho de celosía que tiene un diámetro interno de 1 mm, la solución de inicio se vierte por goteo en un cristizador (dentro del soporte) que contiene la solución gelificante, en la que se inserta un electrodo. El instrumento genera una diferencia de potencial constante entre la punta de la aguja y la superficie libre de la solución gelificante, que se puede ajustar y oscila entre 0 y 10 kV. La diferencia de potencial provoca la separación repentina de la gota de polímero (cargada negativamente) de la punta de la aguja y permite así tener cápsulas incluso con tamaños pequeños ($<200 \mu\text{m}$). Los tamaños de cápsula pueden ajustarse incluso variando otros factores, tales como el diámetro interno de la aguja, la distancia de la aguja respecto a la superficie de la solución gelificante, el caudal del polímero.

Ejemplo 20: Preparación de cilindros

[0090] Los cilindros de gel y los discos de los ejemplos específicos 6, 8 y 9 mencionados anteriormente se prepararon vertiendo la solución que contenía los polisacáridos y el nanocompuesto a base de metal en recipientes en forma de cilindro. El tamaño cilíndrico del hidrogel depende del tamaño de estos últimos. Las dimensiones del recipiente en forma de cilindro son típicamente de 18 mm de altura y 16 mm de diámetro interno, mientras que las de recipientes discoides tienen 8 mm de altura y 16 mm de diámetro interno, incluso si se permiten totalmente tamaños

diferentes (altura y diámetro interno).

Ejemplo 21: Caracterizaciones biológicas

5 A. Actividad antibacteriana

[0091] Para ensayar la actividad antibacteriana de geles nanocompuestos tridimensionales, se esparcieron diferentes cepas bacterianas a diversas concentraciones sobre las superficies de gel. Se ensayaron tanto cepas Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) como cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*,
10 *Staphylococcus epidermidis*). Los controles se representan por geles de agar y geles de alginato-Chitlac sin nanopartículas (geles AC). Después de una incubación "nocturna", las colonias bacterianas son claramente evidentes en los controles pero están completamente ausentes en los geles que contienen nanopartículas (geles AC-nAg) (figura 4), demostrando así la eficacia de la acción bactericida realizada por estos materiales.

15 **[0092]** Además, se preparan microesferas de gel nanocompuesto que contienen nanopartículas de plata (AC-nAg) y se ponen en contacto con soluciones bacterianas (*Escherichia coli*); el control se representa por microesferas de gel de alginato-Chitlac (sin nanopartículas de plata). Los resultados demuestran que la concentración de colonias bacterianas aumenta el control pero disminuye en más de tres unidades logarítmicas en el caso de microesferas con nanopartículas de plata.

20 **[0093]** Incluso las microesferas nanocompuestas obtenidas de acuerdo con el ejemplo 13 y los hidrogeles nanocompuestos obtenidos de acuerdo con los ejemplos 6 y 9 demostraron ser capaces de ejercer una acción antimicrobiana eficaz, como se muestra en las figuras 5 y 6, respectivamente.

25 B. Citotoxicidad

[0094] Se realizaron ensayos para evaluar la citotoxicidad del gel sobre líneas celulares eucariotas, tales como osteoblastos (MG63), hepatocitos (HEPG2) y fibroblastos (3T3). En el ensayo, se evalúa la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) por las células, que está relacionada con el daño celular y la muerte. Los ensayos de
30 LDH demuestran que estos geles nanocompuestos tridimensionales no causan efectos citotóxicos en las células ensayadas, como puede observarse en la figura 7, por ejemplo, en el caso de fibroblastos. De hecho, después de 24 y 72 horas no se encuentran diferencias significativas en la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) entre las células tratadas con AC-nAg y los controles (es decir, células tratadas con geles de alginato-Chitlac y células no tratadas).

35 **[0095]** Se dan resultados comparables en el caso de geles a base de alginato-Chitlac de nanocompuestos tridimensionales similares que contienen nanopartículas de oro (geles AC-nAu); como se observa en la figura 8, este tipo de gel no es citotóxico tampoco para las células eucariotas.

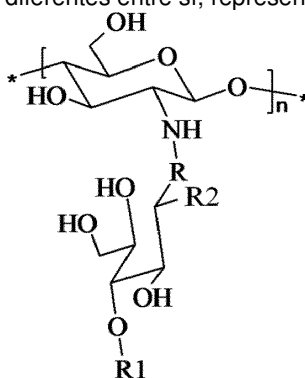
40 **[0096]** La combinación de estos resultados permite concluir que el nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la invención, tal como hidrogeles a base de alginato-Chitlac que contienen nanopartículas formadas y estabilizadas en Chitlac, se proporcionan con una estructura homogénea en la que las nanopartículas no se agregan y tienen una fuerte actividad bactericida, sin ser tóxicos para las células eucariotas. Estos nuevos sistemas nanocompuestos tridimensionales ofrecen las siguientes ventajas:

- 45
- el desarrollo de un sistema integrado que combina la capacidad de los derivados ramificados del quitosano de formar y estabilizar nanopartículas metálicas con actividad bactericida, con las propiedades biológicas ya demostradas en la estimulación celular por las cadenas laterales oligosacáridas de tales derivados de quitosano (Marsich y col., "Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation", Journal of biomedical materials research-Part A, 2008 Feb; 50 84(2): 364-76). Este nuevo enfoque "Glico-Nanotecnológico" proporcionará nuevos instrumentos para el diseño de materiales, que exploten la bioactividad proporcionada por el componente "glicobiológico" y las propiedades especiales de las nanopartículas;
 - la posibilidad de preparar geles tridimensionales con una composición mixta de i) polisacáridos neutros o aniónicos e ii) derivados catiónicos ramificados mono o oligosacáridos de quitosano que atrapan nanopartículas metálicas, explotando la miscibilidad total en condiciones apropiadas entre dos polímeros que pertenecen por separado a cada una de las dos clases i) e ii), aunque tienen cargas opuestas (para los polianiones de la clase i) y a pesar de la presencia de nanopartículas metálicas. Por otra parte, como se conoce, los fenómenos de coacervación con polisacárido aniónico, y en particular con alginato, se producen
- 55

- 5 usando otros polímeros catiónicos no ramificados no oligosacáridos, tal como quitosano;
- se ha descubierto que los geles nanocompuestos obtenidos no son tóxicos para las células eucariotas aunque tengan una fuerte actividad bactericida;
 - el método de gelificación utilizado permite obtener materiales con formas y tamaños que pueden ser adecuados para las diferentes necesidades de aplicación (por ejemplo, películas húmedas y secas, soportes, microesferas, fibras, etc.).

REIVINDICACIONES

1. Un material nanocompuesto tridimensional que comprende una matriz polimérica que consiste en al menos un polisacárido liótropo, termótropo o termo-liótropo, neutro o aniónico, y un nanocompuesto a base de metal que
5 consiste en al menos un polisacárido ramificado catiónico que atrapa uniformemente nanopartículas metálicas, en el que el polisacárido neutro o aniónico se gelifica por medio de agentes de gelificación químicos o físicos adecuados.
2. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los polisacáridos ramificados catiónicos son derivados ramificados de quitosano, en el que las unidades de D-Glucosamina que
10 forman la cadena lineal de quitosano unen, por medio del grupo funcional -NH- en el átomo de carbono C2, residuos de polioles alditólicos o aldónicos, iguales o diferentes entre sí, representados por la fórmula general (II)



(II)

donde:

15

- R es -CH₂- o -CO-;
- R₁ es hidrógeno, un monosacárido, o un oligosacárido;
- R₂ es -OH o -NHCOCH₃.

- 20 3. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los residuos de polioles alditólicos o aldónicos son residuos de mono u oligosacáridos que comprenden de 1 a 3 unidades glicosídicas.
4. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 2, en el que, cuando R₁ es un monosacárido, dicho monosacárido se selecciona del grupo que consiste en galactosa, glucosa, manosa, N-acetil
25 glucosamina, y N-acetil galactosamina.
5. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los residuos de polioles alditólicos o aldónicos se seleccionan del grupo que consiste en residuos de lactosa, celobiosa, celotriosa, maltosa, maltotriosa, quitobiosa, quitotriosa, manobiosa y ácidos aldónicos de los mismos.
30
6. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los derivados ramificados de quitosano tienen un grado de sustitución química del Grupo amina de la unidad de D-Glucosamina mayor del 40 % y hasta del 80 %.
- 35 7. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las nanopartículas metálicas comprendidas en el nanocompuesto a base de metal con polisacáridos ramificados catiónicos son de metales seleccionados del grupo que consiste en plata, oro, platino, paladio, cobre, cinc, níquel, y mezclas de los mismos.
- 40 8. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las nanopartículas tienen un tamaño medio comprendido en el intervalo de 5 nm a 150 nm.
9. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la masa de metal en mg

por g de polisacárido catiónico está comprendida en el intervalo de 3.000 mg/g a 0,3 mg/g.

10. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las relaciones en peso de los polisacáridos neutros o aniónicos con respecto a polisacáridos ramificados catiónicos que comprenden las nanopartículas metálicas están comprendidas en el intervalo de 8:1 a 1:1 (polisacáridos neutros o aniónicos:polisacáridos catiónicos).

11. Los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-10, en los que las matrices poliméricas son hidrogeles o matrices no hidratadas.

12. Los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-11, en los que las matrices poliméricas están en diferentes formas seleccionadas de entre forma de cilindro, microesferas, soportes, placas de gel, películas y fibras.

13. Un material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-12, para su uso como un agente antimicrobiano.

14. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en la cicatrización de heridas.

15. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en aplicaciones quirúrgicas.

16. El material nanocompuesto tridimensional de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en aplicaciones agrícolas y alimentarias.

17. Un método para preparar materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con las reivindicaciones 1-12, **caracterizado por que** dichos materiales nanocompuestos tridimensionales pueden obtenerse preparando soluciones acuosas de mezclas de al menos un polisacárido liótrofo, termótrofo o termo-liótrofo, neutro o aniónico, y de un nanocompuesto a base de metal que consiste en al menos un polisacárido ramificado catiónico que atrapa uniformemente nanopartículas metálicas, en el que dichas soluciones acuosas tienen una fuerza iónica de al menos 50 mM y no superior a 350 mM, y un pH de al menos 7, y tratando dichas soluciones acuosas con agentes químicos o físicos capaces de gelificar los polisacáridos liótropos, termótropos o termo-liótropos, neutros o aniónicos.

18. El método para preparar los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con la reivindicación 17, en el que las soluciones acuosas tienen una osmolaridad comprendida en el intervalo de 250 a 300 mM.

19. El método para preparar los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con la reivindicación 17, en el que los agentes de gelificación para los polisacáridos liótropos o termo-liótropos son soluciones acuosas de sales de iones seleccionados de iones monovalentes, divalentes o trivalentes que tienen concentraciones de 10 mM y hasta 100 mM.

20. El método para preparar los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con la reivindicación 17, en el que los agentes de gelificación para los polisacáridos termótropos o termo-liótropos tienen temperaturas comprendidas en el intervalo de 10 °C a 40 °C.

21. El método para preparar los materiales nanocompuestos tridimensionales de acuerdo con la reivindicación 17, en el que las concentraciones poliméricas de polisacáridos neutros o aniónicos son mayores del 1,5 % y hasta del 4 % (p/v).

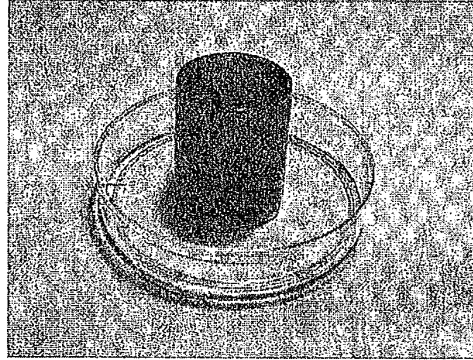


Figura 1

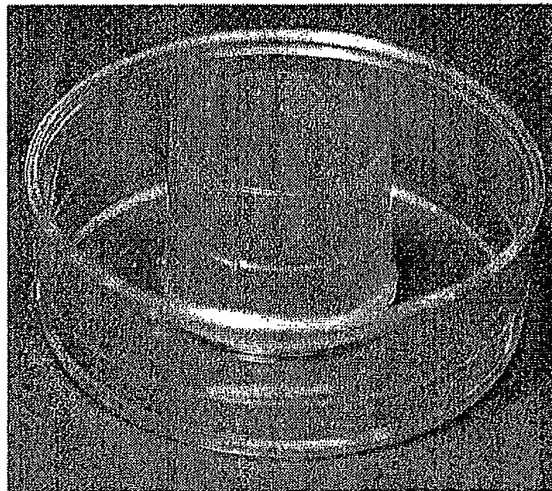


Figura 2



Figura 3

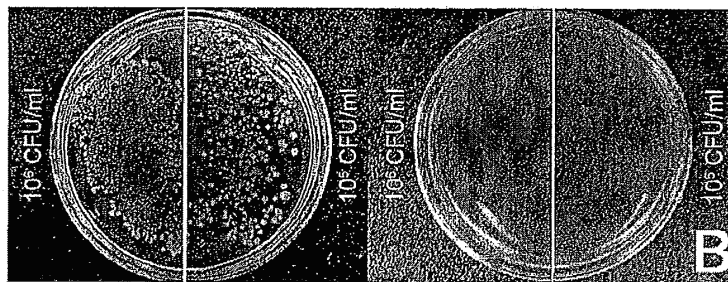


Figura 4

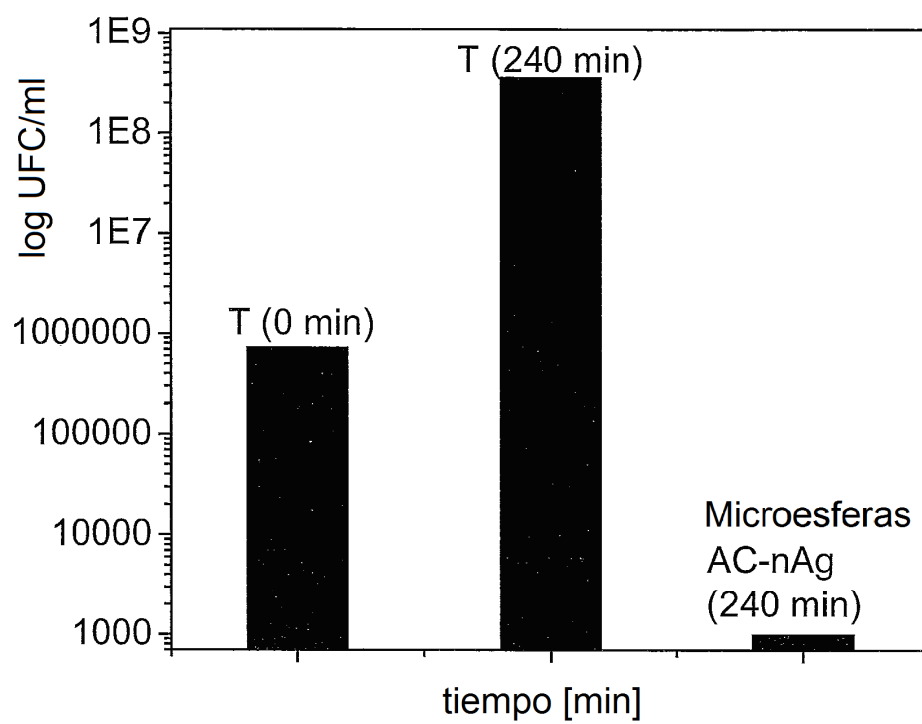


Figura 5

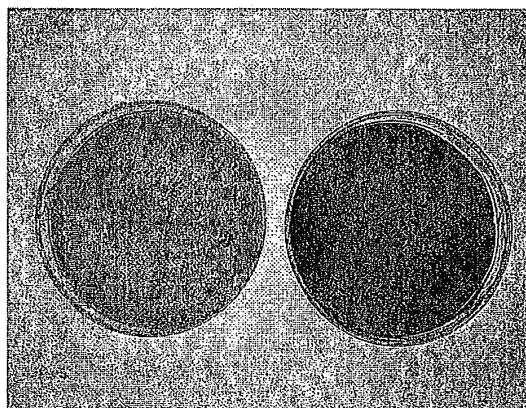


Figura 6

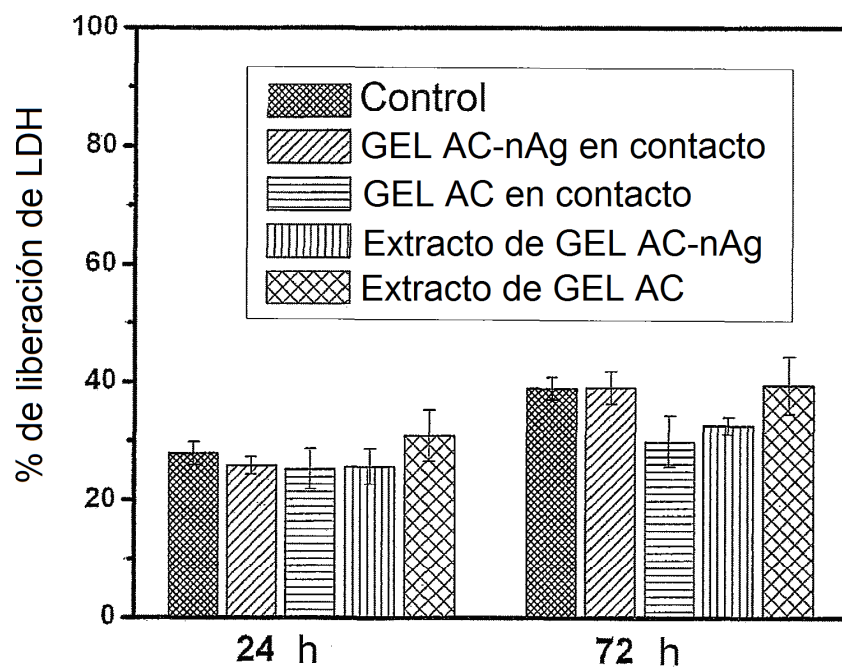


Figura 7

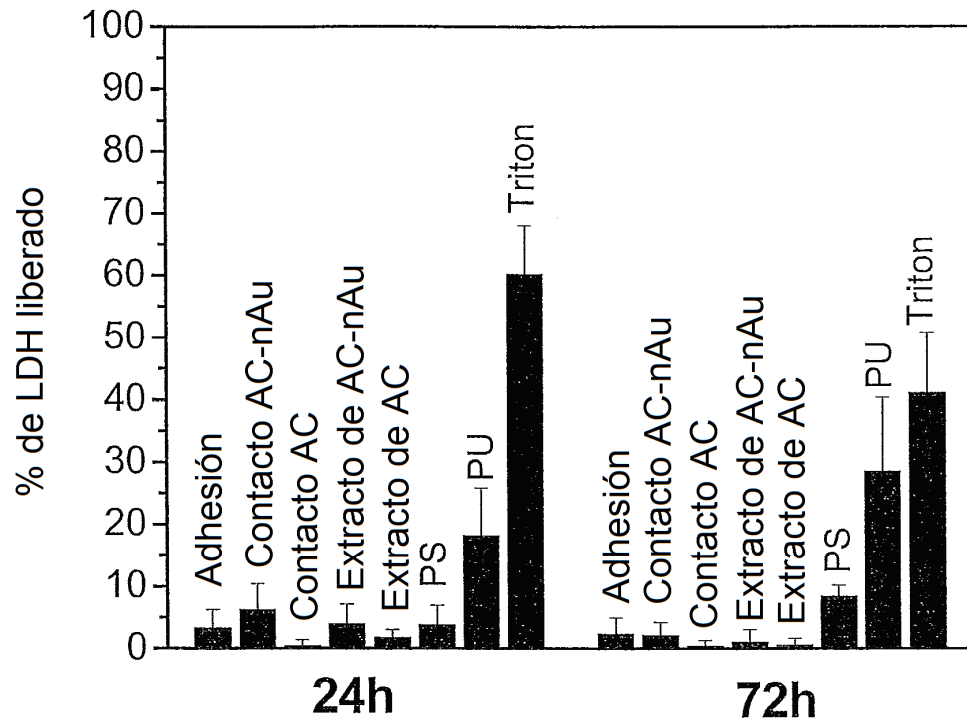


Figura 8